

München 1959

**Untersuchungen über den
Cholesteringehalt in einzelnen
Organen des Kaninchenauges
unter verschiedenen
Versuchsbedingungen**

Bernd Hollenbach

AUS DER AUGENKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Professor Dr. W. Rohrschneider

**Untersuchungen über den Cholesteringehalt
in einzelnen Organen des Kaninchenauges
unter verschiedenen Versuchsbedingungen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

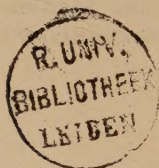
Bernd Hollenbach
aus Herzebrock/Westf.

München 1959

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent:	Priv. Doz. Dr. H. J. KÜCHLE
Correferent:	Professor Dr. W. ROHRSCHEIDER
Dekan:	Professor Dr. H. SCHWIEGK

Tag der mündlichen Prüfung: 10.9.59



Herrn Professor Dr. W. ROHRSCHEIDER danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes im Labor der Universitätsaugenklinik München.

Herrn Privatdozenten Dr. H. J. KÜCHLE bin ich zu besonderem Dank für die Überlassung des Themas und seine freundliche und vielseitige Unterstützung bei dessen Ausarbeitung verpflichtet.

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
I. Einleitung und Fragestellung	7
II. Überblick über das bisherige einschlägige Schrifttum	7
III. Methodik der eigenen Untersuchungen	10
IV. Ergebnisse der eigenen Untersuchungen	15
V. Besprechung der Ergebnisse	23
VI. Zusammenfassung	25
Literaturverzeichnis	27

I.

EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG.

Während eine Reihe von Arbeiten sich mit der Bestimmung der Fettstoffe in den einzelnen Organen des Auges vom Rind befasst, liegen bisher noch keine diesbezüglichen Untersuchungen über quantitative Bestimmungen des Cholesterins im Kaninchenauge weder an unbehandelten, noch an mit Cholesterin gefütterten Tieren vor.

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um Bestimmungen des Cholesteringehaltes der Cornea, Linse, Uvea und Sklera von Augen normalgefügter Kaninchen und solcher, die zu ihrem gewöhnlichen Futter über einen längeren Zeitraum (etwa 15 Wochen) täglich eine bestimmte Menge Cholesterin (1,0 g) erhielten. Dabei war es von Interesse festzustellen, ob durch zusätzliche Verabfolgung bestimmter Wirkstoffe (Heparin, essentielle Fettsäuren) das Ausmass der Cholesterinablagerung in den untersuchten Organen des Auges in einem solchen Masse beeinträchtigt wird, dass dies in eindeutigen quantitativen Unterschieden bei der Cholesterinbestimmung erfassbar wird.

II.

ÜBERBLICK ÜBER DAS BISHERIGE EINSCHLÄGIGE
SCHRIFTTUM.

Die Ergebnisse der bisher vorliegenden Arbeiten auf diesem Gebiet ermöglichen dabei kaum einen Vergleich mit den später zu besprechenden eigenen Versuchsergebnissen, da erstere sich entweder nur mit dem Cholesteringehalt in normalen oder kataraktös veränderten menschlichen Linsen befassen oder aber weil der Gehalt verschiedener Fettstoffe in den einzelnen Organen des Auges anderer Tierarten, nicht aber des Kaninchens bestimmt wurde. Hinzu kommt noch, dass ausserdem meist andere Methoden der Cholesterinbestimmung angewendet wurden. Fast in allen Arbeiten wurden Bestimmungen des Lipoidgehaltes in den einzelnen Organen des Auges vom Rind durchgeführt. Nur zwei Autoren (CAHN, LO CASCIO) ermittelten den Cholesteringehalt auch in Pferde- und Schweineaugen, bei beiden jedoch nur in der Retina. Über den Cholesteringehalt in den einzelnen Organen des Kaninchenauges liegen dagegen, wie schon einleitend betont, keine Arbeiten vor.

Bereits 1928 befassten sich BÜRGER und SCHLOMKA mit der Bestimmung des Cholesteringehaltes in der Hornhaut und Linse des Rindes bei Tieren verschiedenen Alters. KRAUSE berichtete im Jahre 1935 in mehreren Arbeiten über den Lipoidgehalt einzelner Organe des Rinderauges. Eine weitere neuere Mitteilung hierüber liegt von D'ASARO und Mitarbeitern aus dem Jahre 1954 vor. Eine Anzahl von Arbeiten anderer Autoren, SALIT, PURTSCHER, BUNGE, CAHANE und GOLDSCHMIDT, haben den Cholesteringehalt von Rinderlinsen sowie von normalen und kataraktösen menschlichen Linsen zum Gegenstand.

Die Cholesterinbestimmungen der älteren Arbeiten wurden gravimetrisch durchgeführt. SALIT machte die Untersuchungen mit der von BLOOR angegebenen Methode, KRAUSE benutzte die Methode nach MAN und PETERS. Nur D'ASARO und Mitarbeiter wandten das modernere Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Cholesterins, und zwar die Methode von SCHÖNHEIMER und SPERRY bzw. die verbesserte Methode von SPERRY und WEBB, an, die auch zu den eigenen Untersuchungen mit geringen Modifikationen (siehe methodischer Teil) herangezogen wurde.

Von den Ergebnissen früherer Autoren erscheinen besonders die folgenden erwähnenswert. CAHN erhielt für die Rindernetzhaut einen Gehalt von 650 - 770 mg% Cholesterin und für die Netzhaut des Schweines einen solchen von 950 mg%, bezogen auf das Frischgewicht des Organs. JESS fand in der Glaskörperflüssigkeit von Rinderaugen nur einen sehr geringen Gesamtcholesteringehalt von etwa 5 mg%. Diese Angabe deckt sich mit den Ergebnissen einer kurzen Mitteilung von D'ASARO und Mitarbeitern, die schreiben, dass "wenn überhaupt, dann jedoch nur äusserst geringe Mengen Cholesterin in der Glaskörperflüssigkeit vorhanden sind," und mit einer Veröffentlichung von KRAUSE, der weniger als 10 mg angibt. Diese Beobachtungen über einen nur sehr niedrigen Cholesteringehalt der Glaskörperflüssigkeit konnte in eigenen Untersuchungen (Vorversuche) auch für das Kaninchen bestätigt werden.

BÜRGER und SCHLOMKA untersuchten den Cholesteringehalt von Rinderhornhäuten und -linsen in Abhängigkeit vom Alter. Bei ihren Bestimmungen in der Cornea teilten sie das Tiermaterial in vier Altersgruppen ein: Gruppe I, Kälber im Durchschnittsalter von 0,2 Jahren, Gruppe II, Mastochsen im Durchschnittsalter von 3,8 Jahren, Gruppe III, Rinder mit einem Durchschnittsalter von 9,8 Jahren und Gruppe IV, Rinder von 15,4 Jahren; Gruppe III und IV umfassen Milchkühe, die wegen Nachlassen der Milchproduktion zur Schlachtung gebracht wurden. Sie fanden für Gruppe I durchschnittlich

79 mg% Cholesterin in der Hornhautfrischsubstanz, für Gruppe II 121 mg%, für Gruppe III 81 und für Gruppe IV 125 mg%. Die Betrachtung der Ergebnisse lässt den Verfassern zwei massgebliche Faktoren für die Höhe des Cholesteringehaltes der Hornhaut wirksam erscheinen, erstens einen alimentären Faktor in Gruppe II (Mastvieh) und zweitens in Gruppe IV einen Altersfaktor. In Kälberlinsen fanden BÜRGER und SCHLOMKA bei durchschnittlich 2,7 Tage alten Tieren einen mittleren Gehalt von 40,2 mg% Cholesterin. Dieser stieg mit zunehmendem Alter allmählich an. Bei einem Durchschnittsalter von 0,5 Jahren erhielten sie 77,1, bei 3-4 Jahren rd. 100 mg%, in den Altersgruppen von 12-15 Jahren schliesslich sogar 212-216 mg% Cholesterin, bezogen auf das Frischgewicht des Organs. CAHANE fand für Rinderlinsen einen durchschnittlichen Cholesteringehalt von 116-120 mg%.

Bei den Untersuchungen von KRAUSE fanden sich für die einzelnen Organe des Rinderauges bezüglich ihres Gesamtcholesteringehaltes folgende Werte: Sklera 70 mg%, Corneaeepithel 195 mg%, Corneastroma 69 mg%, Linse 66 mg%, Glaskörper weniger als 12 mg%, Chorioidea 140 mg%, Iris 133 mg% und Retina 299 mg%. Die mg%-Zahlen beziehen sich dabei auf das Frischgewicht des Organteils, die untersuchten Organe stammen von Augen einjähriger Rinder.

Von besonderem Interesse wäre im Zusammenhang mit der eigenen Arbeit die Mitteilung von D'ASARO und Mitarbeitern gewesen, da sie dieselbe Methode zur Bestimmung des Cholesteringehaltes wie ich anwendeten. D'ASARO und Mitarbeiter trockneten jedoch die Gewebe der einzelnen Organteile des Rinderauges, um sie erst dann zu zerkleinern und das Cholesterin zu extrahieren. Die Zahlen beziehen sich deshalb bei ihnen auf das Trockengewicht der Organe und lassen sich mit den eigenen Ergebnissen nicht recht vergleichen. Ausserdem wurden auch von diesen Autoren die Untersuchungen an Rinderaugen vorgenommen.

Weitere eigangs erwähnte Arbeiten über den Cholesteringehalt der menschlichen normalen und kataraktösen Linse sind im Hinblick auf die eigene Fragestellung nur von geringerem Interesse und sollen daher nur in Ergänzung angedeutet werden. GOLDSCHMITT bestimmte die Lipide in Linsen von Menschen in Abhängigkeit vom Lebensalter, CAHANE das Cholesterin in normalen Linsen vom Rind sowie in normalen und kataraktösen Linsen vom Menschen verschiedener Altersklassen. SALIT veröffentlichte eine Reihe von Arbeiten über denselben Gegenstand. Eine Arbeit BUNGEs befasst sich ebenfalls mit dem Cholesteringehalt normaler und getrüübter menschlicher

Linsen und PURTSCHER schrieb schliesslich über den Cholesteringehalt der Linse bei Katarakta coronaria.

III. METHODIK DER EIGENEN UNTERSUCHUNGEN.

a) FÜTTERUNG DER TIERE

Kaninchen gleichen Wurfes wurden gleichmässig auf 4 Versuchsgruppen zu je 7 Tieren verteilt. Alle Tiere waren gleichen Alters und wogen zu Beginn der Versuche zwischen 2-3 kg. Die Dauer der Cholesterinfütterung betrug 14-16 Wochen.

Gruppe I bekam während dieser Zeit gewöhnliches Kaninchenfutter, bestehend aus Grün- und Körnerfutter. (Gruppe N = normale Kontrolltiere).

Gruppe II erhielt zusätzlich täglich mit einer Schlundsonde 1,0 g Cholesterin in 2 ccm Olivenöl. (Gruppe C = Cholesterintiere).

Gruppe III wurde wie Gruppe II mit Cholesterin gefüttert, ausserdem erhielten diese Tiere zusätzlich täglich 10 mg = 1000 E Heparin intramuskulär (Gruppe H), während Gruppe IV in derselben Cholesterinölmenge täglich 10 Kapseln = 1,2 g Essentiale (ungesättigte Fettsäure verabreicht bekam (Gruppe E).

Zur Herstellung des Fütterungsgemisches wurden Cholesterin und Olivenöl im Verhältnis von 1 g Cholesterin auf 2 ccm Olivenöl vermengt. Dieses Gemisch wurde auf 60-70° erhitzt und anschliessend im Wasserbad abgekühlt, bis es eine feste Konsistenz annahm. Schliesslich wurde die zähflüssige Masse im Mörser so lange gerührt, bis ein gleichmässig sahniger Brei entstand. Zur Fütterung der Tiere wurden Nélaton-Katheter von 19 oder 20 Charrière verwendet.

b) BESTIMMUNG DES GESAMTCHOLESTERINS IN EINZELNEN ORGANEN DES AUGES.

Nach 14-16 Wochen erfolgte die Tötung der Tiere. Die Kaninchen wurden, um ein besseres Ausbluten zu erreichen, dekapitiert. Unmittelbar darauf erfolgte die Eukleation der Augen und ihre Weiterverarbeitung.

Die Cornea wurde sorgfältig am Limbus abgetragen und die Linse samt Kapsel herausgenommen. Dann wurde der Bulbus umgestülpt und mit einer

Pinzette vorsichtig die Uvea in toto abgezogen und schliesslich die Sklera von jeglichem fremden Gewebe gesäubert.

Anschliessend wurde mit einer analytischen Waage das Gewicht der einzelnen Organteile bestimmt.

In Vorversuchen wurde die Frage der optimalen Extraktion geklärt. Die Extraktion des Cholesterins erfolgte mit BLOORs Reagenz (Ätheralkohol im Verhältnis 1:3) in einem Mengenverhältnis zum Organgewicht von 30:1. Das Extraktionsmittel wurde in drei gleiche Teile geteilt und das Organ mit ihm im Homogenisator nach Bühler in einem 10 ccm Glaseinsatz dreimal nacheinander bei 50.000 U/min ganz fein zerkleinert und zugleich extrahiert. Hierzu wurde das grobzerkleinerte Organ in den Glaseinsatz gefüllt und die errechnete Menge Extraktions- und Suspensionsflüssigkeit jeweils hinzupipetiert, danach dann 3 Minuten lang bei der angegebenen Tourenzahl homogenisiert. Anschliessend wurde der Extrakt nach jedem Homogenisieren durch Umfüllen der Suspensionsflüssigkeit in Stahlbecher und Zentrifugieren in einer Ultrazentrifuge bei 15.000 U/min gewonnen. Die feinzerkleinerten Organteile setzten sich dadurch am Boden des Stahlbeckers ab und der darüber stehende abgepresste Extrakt konnte in Erlenmeierkölbchen abgeschüttet werden. Derselbe Vorgang wurde mit dem Suspensat nach zweimal wiederholt.

Vom Gesamtextrakt pipetierten wir jeweils 3 ccm in Zentrifugengläser und verseiften diese Menge Extrakt mit 3 Tropfen 50 %iger Kalilauge, wobei etwa 4 Minuten das Ganze mit einem Glasstab kräftig durchmischt und anschliessend eine halbe Stunde unter öfterem kräftigen Mischen im Wasserbad bei einer Temperatur von 37° gehalten wurde.

Den verseiften Extrakt füllten wir mit Acetonalkohol (im Verhältnis 1:1) auf 6 ccm auf und gaben als Indikator in jedes Zentrifugenglas einen Tropfen Phenolphthalein. Dann wurde mit 10 %iger Essigsäure bis zum Farbumschlag titriert und zur Herstellung eines leicht sauren Milieus noch ein Tropfen im Überschuss hinzugegeben.

Zur Fällung des Cholesterins diente frische Digitoninlösung (1 %ig in 50 %igem vergälltem Alkohol). Wir gaben 0,5 ccm Lösung auf 1 ccm verseiften Extrakts, insgesamt also 3 ccm, und liessen es zur vollständigen Ausfällung 18 Stunden stehen.

Am nächsten Tag füllten wir die Zentrifugengläser mit etwas Acetonalkohol auf und brachten mit einem Glasstab den Cholesterinrand, der sich gebildet

hatte, wieder in die Flüssigkeit. Danach wurde der Acetonalkohol durch Zentrifugieren vom gefällten Cholesterindigitonid getrennt und der überstehende Acetonalkohol vorsichtig abgesaugt. Das Cholesterindigitonid wurde sodann zweimal gewaschen, das erste Mal mit einem Aceton-Äthergemisch (im Verhältnis 1:2). Hierzu wurden die Zentrifugengläser etwa zu einem Drittel mit Acetonäther aufgefüllt und das Cholesterindigitonid mit einem Glasstab darin aufgewirbelt. Den restlichen Acetonäther gaben wir am Stab entlang hinzu, um diesen abzuspielen. Dann wurde wieder zentrifugiert und das überstehende Aceton-Äthergemisch vorsichtig abgesaugt. Die zweite Waschung erfolgt auf dieselbe Weise mit reinem Äther. Nach dem Waschen wurde der restliche Äther im Wasserbad abgedampft und darauf das Cholesterindigitonid im Trockenschrank getrocknet.

Das gut getrocknete Cholesterindigitonid lösten wir in 2 ccm Eisessig, wobei der Eisessig am Glasstab entlang hinzupipettiert wurde, um auf diese Weise das an ihm haftende Cholesterindigitonid mitabzuwaschen. Danach wurde das Ganze bis zur Lösung vorsichtig erhitzt. Zur Färbung gaben wir 2 ccm eines jeweils frisch bereiteten Essigsäureanhydrid-Schwefelsäuregemisches (im Verhältnis 20:1) hinzu und mischten das Ganze mit einem Glasstab kräftig durch.

Bei den geschilderten Arbeitsgängen ist unbedingt darauf zu achten, dass für dasselbe Zentrifugenglas stets derselbe Stab benutzt wird.

Nach genau einstündiger Farbentwicklung im Dunkeln wurde mit dem Spektralphotometer nach Beckmann Modell DU bei einer Wellenlänge von 630 m μ und einer Spaltbreite von 0,03 die Extinktion bestimmt.

Da hinsichtlich des optimalen Messbereiches unterschiedliche Angaben vorliegen (GÖRTZ 529 m μ , SCHÖNHEIMER und SPERRY 620 m μ , ZEISS, Photometrische Analysen, 1958, 587 m μ), erschien es wichtig, diesen anhand eigener Untersuchungen nochmals genau festzustellen.

Es wurde zu diesem Zweck eine Kurve aufgestellt, die wir von den Extinktionen reinen Cholesterins, gelöst in Eisessig und gefärbt mit Essigsäure-Anhydrid-Schwefelsäuregemisch, in den verschiedenen Wellenlängenbereichen von 500-800 m μ erhielten. Eine zweite Kurve wurde für die Extinktionen des Gesamtcholesterins in Kaninchenserum bei denselben Wellenlängenbereichen ermittelt.

Der Gipfel, das Maximum der Extinktion, der Kurve für reines Cholesterin, liegt auf einem Plateau zwischen 620-670 m μ , das bei etwa 650 m μ einen

kleinen Gipfel zeigt. (Abb. 1) Bei der Kurve für das Gesamtcholesterin im Kaninchenserum fand sich ebenfalls ein Plateau zwischen 610 und 670 μ . Diese Kurve zeigte keine ausgesprochene Gipfelbildung, sondern nur eine kleine Erhöhung zwischen 620-630 μ (Abb. 1). Ausserdem fällt diese Kurve gegenüber der von reinem Cholesterin in den kürzeren Wellenlängenbereichen bis 560 μ sanfter ab. Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass im Bereich des Plateaus zwischen 620-670 μ gemessen werden muss. Da beide Kurven sich ungefähr decken, schien es uns am günstigsten, das Maximum der Extinktion, das wir für das Kaninchenserum erhielten, nämlich 620-630 μ , als Messbereich zu wählen.

Abbildung 1

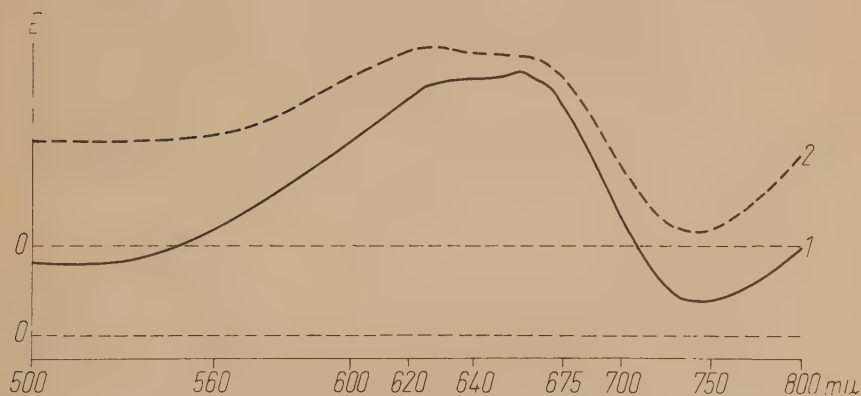


Abb. 1 Die Extinktionen für reines Cholesterin und Cholesterindigitonid eines Kaninchenserums, gefärbt mit Essigsäureanhydrid-Schwefelsäuregemisch in den verschiedenen Wellenlängenbereichen, graphisch dargestellt. (Ordinate: Extinktion; Abszisse: Wellenlängen). Kurve 1 = reines Cholesterin; Kurve 2 = Cholesterindigitonid.

Zur Ermittlung des methodischen Fehlers beim eigenen Vorgehen der Cholesterinbestimmung in Sklera, Uvea, und Linse wurden stets Doppelbestimmungen durchgeführt. Aus der Differenz der beiden Einzelresultate jeder Doppelbestimmung liessen sich dann gewisse Rückschlüsse auf den methodischen Fehler bei der Cholesterinbestimmung in einzelnen Organen ziehen. Über den Umfang der durchgeführten Doppelbestimmungen und dem gefundenen methodischen Fehlerbereich bei der Analyse einzelner Organewebe gibt die folgende Übersicht (Tab. 1) nähere Auskunft.

Tabelle 1

Methodischer Fehler bei der Cholesterinbestimmung in einzelnen Organen

Organ	Anzahl der Doppelbestimmungen	Durchschnittl. Differenz zw. den Einzelbestimmungen	Streuung der Differenz
Sklera	16	6,5	5
Uvea	23	7,3	9
Linse	12	4,0	4

Setzt man die Einzelwerte jeder Doppelbestimmung in Beziehung zur Höhe des Mittelwertes aus beiden, so zeigt sich, dass der methodische Fehler bei hohen Cholesterinwerten (Organe von mit Cholesterin gefütterten Tieren) nicht nennenswert grösser war als bei niedrigeren Werten normaler Kontrolltiere. Dies besagt, dass er weitgehend unabhängig von der Höhe des Cholesteringehaltes ist, also bei höheren Cholesterinwerten prozentual erheblich kleiner wird.

c) BESTIMMUNG DES GESAMTCHOLESTERINS IM SERUM.

Das aus der Ohrvene gewonnene Blut wurde zentrifugiert und das Serum abpipettiert. Anschliessend erfolgte die Extraktion mit einem Aceton-Alkoholgemisch (Verhältnis 1:1). Dazu wurden 0,5 ccm Serum in ein 15 ccm Messkölbchen, dessen Boden etwa fingerbreit mit Acetonalkohol bedeckt war,

pipettiert und im Wasserbad bis zum Sieden erhitzt. Anschliessend wurde das Kölbchen bis zur Marke mit Acetonalkohol aufgefüllt, der Inhalt kräftig durchgeschüttelt und in Reagenzgläser filtriert. (Filter Schleicher & Schüll 588). Vom Filtrat jedes Serums wurden zweimal 3 ccm zur Vornahme der auch hier angezeigten Doppelbestimmung (Ermittlung des methodischen Fehlers) in der schon oben näher beschriebenen Weise weiterverarbeitet. Lediglich zur Verseifung wurden hier 5 Tropfen Kalilauge und als Indikator 2 Tropfen Phenolphthalein verwandt.

IV.

ERGEBNISSE DER EIGENEN UNTERSUCHUNGEN.

Die bei der quantitativen Cholesterinbestimmung in einzelnen Organen des Auges bei den schon oben genannten Tierversuchsgruppen gefundenen mg%-Werte sind in den folgenden Tabellen zusammengestellt.

a) GRUPPE N (normale Kontrolltiere)

TABELLE 2: Cholesteringehalt verschiedener Augenorgane in mg% bei normalen, nicht mit Cholesterin gefütterten Kaninchen.
(Tabelle siehe nächste Seite !)

Wie aus Tabelle 2 hervorgeht, fand sich bei 6 normalen, d.h. nicht mit Cholesterin gefütterten Kaninchen, ein durchschnittlicher Gesamtcholesteringehalt der Hornhaut von 63 mg%, wobei die Werte bei einzelnen Tieren individuell nur verhältnismässig wenig schwankten. (Streuung $\sigma = \pm 14$ mg%). Ein ähnlicher Cholesteringehalt, nämlich im Durchschnitt 79 mg%, mit etwas grösserer Streuung ($\sigma = \pm 29$ mg%) konnte für die Sklera ermittelt werden.

Der durchschnittliche Cholesteringehalt der Linse lag mit 121 mg% bei allerdings noch grösserer Streuung der Werte der Einzelorgane ($\sigma = \pm 50$ mg%) höher als der von Hornhaut und Sklera. Die grösste Cholesterinmenge fand sich in der Uvea (durchschnittlich 252 mg%), wobei allerdings die Werte von Tier zu Tier besonders stark schwankten ($\sigma = \pm 90$ mg%). Den erhöhten Cholesteringehalt der Uvea kann man dabei wohl kaum einer möglicherweise trotz Ausbluten der Tiere noch vorliegenden relativen Blutfülle dieses Organes zuschreiben, weil der Gehalt des Blutserums an Gesamtcholesterin nur in der Grössenordnung der in Hornhaut und Sklera gefundenen Werte liegt.

Tabelle 2 (Angaben in mg%)

Kanin- chen-Nr.	Gesamtcho- lesterin i. S. vor Choleste- rinflütterung	Menge des insges. ver- fütt. Chole- sterins bei d. letzt. Se- rumbestimmg.	Gesamtchole- sterin i. S. am Tag d. letzten Blutentnahme (13. Fütt. Woche)	Menge des insges. ver- fütt. Chole- sterins bei der Tötung	Gesamtcholesterin in den einzelnen Organen		
					Cornea	Linse	Sklera
26	-	-	-	-	72 ^{xx}	214(218/210 ^x)	188 50(50/-)
27	-	-	-	-	44	78(82/74)	263(268/258) 69(69/69)
29	-	-	-	-	58	91(95/87)	284 86(86/-)
30	-	-	-	-	84	132(95/87)	411(407/415) 114(118/110)
31	-	-	-	-	57	122(122/122)	174 74
32	-	-	-	-	64	87(87/87)	190(182/198) 78(76/80)
Zahl der Versuche					6	6	6
Durchschnitt und Streuung					63 ± 14	121 ± 50	252 ± 90 79 ± 29

In Gruppe N wurden keine Bestimmungen des Serumcholesterins vorgenommen.

x Die Werte der jeweiligen Einzelbestimmungen stehen in Klammern hinter dem Mittelwert der Doppelbestimmung.

xx Wo nur ein Wert angegeben ist, konnten wegen zu wenig Material nur Einzelbestimmungen durchgeführt werden.

b) GRUPPE C (mit Cholesterin gefütterte Tiere)

Tabelle 3: Cholesteringehalt verschiedener Augenorgane in mg% bei mit Cholesterin gefütterten Tieren (täglich 1 g über 14-16 Wochen).

(Tabelle siehe nächste Seite !)

Wie aus Tabelle 3 ersichtlich, bleibt der Gehalt der Linse an Cholesterin nach einer protrahierten Zufütterung dieser Substanz über viele Wochen praktisch unbeeinflusst. Der etwas höhere Durchschnittswert (150 mg% in Gruppe C gegenüber 121 mg% in Gruppe N) dürfte im Hinblick auf die Streuung der Einzelwerte in beiden Gruppen ($\sigma = \pm 50$ mg% bzw. $\sigma = \pm 31$ mg%) sicher als zufallsbedingt anzusehen sein.

Dagegen findet im Gefolge der Cholesterinverfütterung eine erhebliche Anreicherung dieser Substanz in Hornhaut, Sklera und Uvea statt, wobei allerdings im Einzelfalle erhebliche Unterschiede der gefundenen mg%-Werte entstehen. Trotz der hierdurch bedingten beträchtlichen Streuung kann es keinem Zweifel unterliegen, dass in die genannten Organe in erheblichem Masse Cholesterin eingelagert wird. Dies geht ja auch schon aus der klinischen Beobachtung (Auftreten eines Arcus lipoides corneae während der Cholesterinmast) eindeutig hervor. Bemerkenswert erscheint jedoch bei Berücksichtigung der vorliegenden Analysenergebnisse, dass die Sklera und vor allem die Uvea in noch stärkerem Masse als die Hornhaut Cholesterin speichern. Unter Berücksichtigung der errechneten Mittelwerte liegt der Cholesteringehalt der Cornea in Gruppe C 3-4 mal so hoch wie in der Kontrollgruppe N, während der der Sklera 4 mal so hoch und der der Uvea sogar 6 mal so hoch zu veranschlagen ist.

c) GRUPPE H (Cholesterinfütterung + Heparinanwendung)

Tabelle 4: Cholesteringehalt verschiedener Augenorgane in mg% bei mit Cholesterin gefütterten und gleichzeitig mit Heparin behandelten Kaninchen.

(Tabelle siehe nächste Seite !)

Tabelle 4 lässt erkennen, dass unter dem Einfluss von zusätzlich zum Cholesterin verabfolgten Heparin bei ebenfalls normalem Cholesteringehalt der Linse in den übrigen untersuchten Organen des Auges die Cholesterinanreicherung zwar ebenfalls deutlich, aber weniger ausgeprägt als in Gruppe C

Tabelle 3 (Angaben in mg%)

Kanin- chen-Nr.	Gesamtcho- lesterin i. S. vor Choleste- rin fütterung	Menge des inges. ver- füt. Chole- sterins bei d. letzt. Se- rumbestimmg.	Gesamtchole- sterin i. S. am Tag d. letzten Blutentnahme (13. Fütt. Woche)	Menge des inges. ver- füt. Chole- sterins bei der Tötung	Gesamtcholesterin in den einzelnen Organen			
					Cornea	Linse	Uvea	Sklera
1	80 (83/78)	73 g	1032(1032/1032)	93 g	364	179(182/175)	1052	348
2	93 (90/96)	73 g	1962(1970/1954)	81 g	315	115(110/120)	1629(1614/1644)	439(442/436)
3	53 (53/53)	73 g	1549(1556/1542)	93 g	171	166(168/164)	2929(2929/2929)	395(400/390)
4	57 (60/53)	73 g	2588(2588/2588)	87 g	221	189(190/188)	2929(2929/2929)	1248(1250/1246)
6	78 (76/80)	73 g	681(688/674)	84 g	73	120(122/118)	490(490 -)	142(146/138)
7	75 (74/76)	73 g	662(666/658)	90 g	162	126(127/125)	817	323
8	82 (81/83)	73 g	1090(1090/-)	78 g	175	124(126/122)	1135(1135/1140)	445(453/437)
Zahl d. Versuche	7		7		7	7	7	7
Durchschnitt u. Streuung		73		86,5	212 ± 99	145 ± 31	1569 ± 990	349 ± 112

Tabelle 4 (Angaben in mg%)

Kanin- chen-Nr.	Gesamtcho- lesterin i. S. vor Cholesterin- fütterung	Menge des insges. ver- füt. Chole- sterins bei d. ltzt. Se- rumbestimmg.	Gesamtchole- sterin i. S. am Tag d. letzten Blutentnahme (13. Fütt. Woche)	Menge des insges. ver- füt. Chole- sterins bei der Tötung	Gesamtcholesterin in den einzelnen Organen		
					Cornea	Linse	Uvea Sklera
10	122(118/125)	73 g	983(978/988)	81 g	72	90(85/95)	912(912/-) 168(168/168)
11	96(93/99)	73 g	556(554/558)	90 g	220	86(86/86)	565(570/560) 260(265/255)
15	79(83/74)	76 g	1203(1200/1206)	84 g	132	135(132/138)	1479(1476/1482) 388(385/391)
16	85(87/83)	76 g	651(654/648)	87 g	134	153(154/152)	720(720/-) 194(198/190)
Zahl der Versuche	4		4		4	4	4
Durchschnitt u. Streuung		74,5		85,5	139 ± 73	116 ± 33	919 ± 399 252 ± 113



(nur Cholesterinfütterung) ist. Die gefundenen Werte liegen für alle Organe einheitlich um etwa ein Drittel niedriger als bei den nur mit Cholesterin behandelten Tieren. Infolge der auch in Gruppe H nicht unerheblichen individuellen Schwankungen der Einzelwerte ist bei dem verhältnismässig kleinen Untersuchungsgut die Differenz der Organwerte zwischen Gruppe H und Gruppe C statistisch durch den t-Test nach Student nicht zu sichern. Die Einheitlichkeit und Gleichmässigkeit der unterschiedlichen Ergebnisse für alle Organe (die Mittelwerte liegen bei Gruppe H immer um ein Drittel niedriger als bei Gruppe C) lässt trotzdem wohl den Schluss zu, dass durch Heparin das Ausmass der Cholesterinablagerungen in gewissem Umfang reduziert werden kann.

d) GRUPPE E (Cholesterin- plus Essentialefütterung)

Tabelle 5: Cholesteringehalt verschiedener Augenorgane in mg% bei mit Cholesterin gefütterten und gleichzeitig mit Essentiale behandelten Kaninchen. (Tabelle siehe nächste Seite !)

Wie Tabelle 5 zeigt, liegen die Durchschnittswerte des Cholesteringehaltes, auch hier wieder mit Ausnahme der Linse, der untersuchten Organe des Auges etwas unter denen der nur mit Cholesterin behandelten Tiere (Gruppe C). Der Unterschied ist dabei jedoch weniger eindrucksvoll als bei den zusätzlich mit Heparin behandelten Kaninchen der Gruppe H. Die Einheitlichkeit der Ergebnisse bei allen untersuchten Organen lässt auch hier vielleicht an einen gewissen Effekt essentieller Fettsäuren denken, wobei deren Wirkung im Sinne einer Verhinderung von Cholesterinablagerungen aber der des Heparins zweifellos nachsteht.

Die folgende Abbildung (Abb. 2) gibt einen zusammenfassenden Überblick über die oben in Tabellen dargestellten Analysenergebnisse (Tab. 2-5) und unterstreicht anhand eines Schaubildes nochmals die bisher über die Untersuchungsergebnisse gemachten Ausführungen.

Abbildung 2

Auf der Ordinate sind die für die einzelnen Organe gefundenen mg%-Werte Cholesterin aufgetragen, auf der Abszisse wurden die untersuchten Organe in der in den Tabellen angegebenen Reihenfolge angeordnet. Gruppe N  Gruppe C 

Gruppe H



Gruppe E



Tabelle 5 (Angaben in mg%)

Kanin- chen-Nr.	Gesamtcholesterin i. S. vor Cholesterin- rinfütterung	Menge des inges. ver- füt. Cholesterins bei d. letzt. Serum- bestimmung.	Gesamtcholesterin i. S. am Tag d. letzten Blutentnahme (13. Fütt. Woche)	Menge des inges. ver- füt. Cholesterins bei der Tötung	Gesamtcholesterin in den einzelnen Organen		
					Cornea	Linse	Uvea Sklera
17	94(92/97)	76 g	1435(1440/1430)	90 g	194	103(103/103)	568 265
19	88(87/89)	76 g	1090(1090/1090)	84 g	66	118(118/118)	592(599/605) 286(286/286)
20	107(-/-)	76 g	1181(1180/1182)	78 g	74	121(117/125)	1293(1293/-) 594(597/591)
21	109(105/113)	76 g	1349(1349/1353)	81 g	110	77(73/81)	744(740/748) 217(220/214)
22	111(110/112)	76 g	2591(-/2591)	87 g	410	153(160/158)	2640(2640/2640) 779(789/775)
23	76(79/74)	76 g	821(818/824)	93 g	142	117(117/117)	893(893) 265
Zahl der Versuche	6		6		6	6	6
Durchschnitt u. Streuung		76		85,5	166 ± 41	116 ± 27	1122 ± 790 401 ± 228

V. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE.

Bei einem Vergleich der eigenen Ergebnisse bezüglich des Cholesteringehaltes in normalen Kaninchenorganen mit den Resultaten der Untersuchungen anderer Autoren ist zunächst zu berücksichtigen, dass diese, wie eingangs erwähnt, mit zum Teil anderen Bestimmungsverfahren arbeiteten und dass bisher fast nur Untersuchungen an Rinderaugen durchgeführt wurden. Vielleicht kann man dennoch gewisse Vergleiche ziehen, zumal Rind und Kaninchen reine Pflanzenfresser sind.

BÜRGER und SCHLOMKA erhielten für die Rindercornea in den verschiedenen Altersgruppen einen Gehalt von 79, 81, 121 und 125 mg% Gesamtcholesterin. Die beiden ersten Ergebnisse liegen also in der Größenordnung der eigenen mit 63 mg% und einer Streuung von ± 14 mg%. Die höheren Werte der beiden anderen Gruppen von BÜRGER und SCHLOMKA sind wohl mit den eigenen nicht in Beziehung zu setzen, weil sie von extrem alten Tieren und von ausgesprochenem Mastvieh stammen.

KRAUSE untersuchte getrennt den Cholesteringehalt des Corneaepithels und des Hornhautstromas. Er fand für letzteres einen Durchschnittswert von 69 mg%, was den eigenen Ergebnissen der Hornhautanalysen des Kaninchens entspricht, während bei ihm das Epithel mit einem Wert von 195 mg% wesentlich reicher an Cholesterin war.

CAHANE erhielt bei Rinderlinsen einen durchschnittlichen Cholesteringehalt von 116-120 mg%. BÜRGER und SCHLOMKA fanden bei neugeborenen Kälbern 40,2 mg%, bei halbjährigen Rindern 77,1 mg%, bei 3-4jährigen rund 100 mg% und bei extrem alten Tieren sogar 212-216 mg% Gesamtcholesterin in der Linse. KRAUSE dagegen konnte lediglich 60 mg% Cholesterin in der Linse einjähriger Rinder finden. Die eigenen Analyseergebnisse normaler Kaninchenlinsen liegen bei 121 mg% mit einer Streuung von ± 50 mg% und sind so mit denen von CAHANE bei einjährigen und den von BÜRGER und SCHLOMKA bei halbjährigen Rindern gewonnenen gut zu vergleichen, während die Werte, welche KRAUSE angab, bemerkenswert niedrig liegen. Dagegen stimmen die von KRAUSE für die Sklera gefundenen Werte mit 69 mg% Gesamtcholesterin beim Rind mit den eigenen für das Kaninchen (79 mg%) bei einer Streuung von ± 29 mg% wieder auffallend gut überein.

Über den Cholesteringehalt der Uvea liegen in der mir zugänglichen Literatur bisher keine Angaben anderer Untersucher vor.

Im Gefolge einer langwöchigen Cholesterinfütterung nahm der Gehalt an dieser Substanz in Hornhaut, Sklera und Uvea erheblich zu, während in der Linse keine Cholesterinanreicherung festgestellt werden konnte. (Siehe Tab. 2-5). Damit darf gesagt werden, dass im Gefolge einer intensiven alimentären Hypercholesterinämie keine Cholesterinspeicherung in der Linse auftritt. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Feststellung von U. BIERWIRTH (Diss. München 1958), die bei mit Cholesterin gefütterten Kaninchen im Kammerwasser keine Cholesterinkristalle fand. Es wird also der Linse, die bezüglich Ernährung und Stoffwechsel in hohem Masse vom Kammerwasser abhängig ist, bei einer Hyperlipämie nicht vermehrt Cholesterin zur Aufnahme angeboten. Dies ist wohl als wesentliche Ursache für das Ausbleiben einer Cholesterinspeicherung in der Linse zu betrachten, während die Frage, ob deren Kapsel für Cholesterinmoleküle permeabel oder undurchlässig ist, anhand eigener Untersuchungen nicht beantwortet werden kann und damit noch offen bleiben muss.

In der Cornea fand sich nach langdauernder Fütterung von Cholesterin (14-16 Wochen) ein durchschnittlicher Gehalt von 212 mg% Gesamtcholesterin mit einer Streuung von ± 99 mg%. Das bedeutet eine durchschnittlich etwa 3-4fache Zunahme dieser Substanz beim Vergleich mit normalen Kaninchen, deren Cornea im Durchschnitt nur 63 mg% (± 14 mg%) enthielt.

In der Sklera fanden sich hinsichtlich einer Cholesterinanreicherung nach Zufuhr dieser Substanz weitgehend ähnliche Verhältnisse wie in der Hornhaut. Hier nahm der Gesamtcholesteringehalt durchschnittlich um das etwa 4-fache gegenüber dem normalen zu. (Siehe Tabelle 2 und 3).

In der Uvea, dem am besten durchbluteten Gewebe des Auges, kam es zur stärksten Ablagerung von Cholesterin. Hier stieg der Gesamtcholesteringehalt bei den gemästeten Kaninchen im Durchschnitt um das etwa 6-fache von einem Durchschnittswert von 252 mg% (Normaltiere) auf 1569 mg% (Cholesterintiere) an.

Unter dem Einfluss einer zusätzlichen Anwendung von Heparin war die Cholesterinspeicherung in den genannten Organen des Auges weniger ausgesprochen (siehe Tab. 3 und 4), so dass man, wie oben schon angedeutet, von einem der Cholesterinimprägnation entgegenwirkenden Effekt des Heparins wohl sprechen darf. Diese Befunde erscheinen bemerkenswert, weil

ihnen womöglich eine Bedeutung im Rahmen der Arteriosklerosetherapie (Verhinderung atheromatöser Plaques) zukommen könnte.

Die zusätzlich zur Cholesterinfütterung angewandten essentiellen Fettsäuren in Form der Substanz Essentiale "Nattermann" vermochten die Cholesterin-anreicherung in Hornhaut, Sklera und Uvea, wenn überhaupt, so nur in geringerem Masse als Heparin zu unterdrücken (siehe Tab. 3-5).

Vergleichen wir die Ergebnisse sämtlicher Organanalysen, wie sie in Abb. 2 noch einmal übersichtlich graphisch dargestellt sind, so fällt in allen Versuchsgruppen und für alle untersuchten Organe eine relativ grosse Streuung der Einzelwerte auf. Ähnliche Verhältnisse finden sich auch bezüglich des Gesamtcholesterins im Serum innerhalb der einzelnen Gruppen (siehe Tab. 3-5).

Dabei drängt sich unwillkürlich die Frage auf, ob sich im Verhalten des Serumcholesterins und dem Cholesteringehalt der Augenorgane Beziehungen in dem Sinne finden, dass hohe und relativ niedrige Werte einander parallel gehen. Stellt man unter diesem Gesichtspunkt vergleichende Betrachtungen an, so lässt sich sagen, dass meist eindeutige Relationen zwischen Höhe des Serumcholesterins und des Cholesteringehaltes in den Augenorganen bestehen. Man findet nie bei demselben Tier im Serum und in den verschiedenen Organen hohe und niedrige Gesamtcholesterinwerte nebeneinander.

VI.

ZUSAMMENFASSUNG.

Es wurden an Kaninchen Bestimmungen des Gesamtcholesterins im Blutserum sowie in verschiedenen Organen des Auges (Hornhaut, Lederhaut, Gefäßhaut und Linse) nach der für diesen Zweck modifizierten Methode von SCHÖNHEIMER und SPERRY bzw. SPERRY und WEBB durchgeführt. Dabei interessierte neben dem Cholesteringehalt normaler Kaninchen das Ausmass des Ansteigens der Werte nach langfristiger Cholesterinverfütterung (täglich über 14-16 Wochen) und die Frage, ob der Umfang der Cholesterinablagerung durch zusätzliche Anwendung von Heparin und essentiellen Fettsäuren (Präparat Essentiale "Nattermann") quantitativ erfassbar zu beeinflussen ist.

Als normaler Cholesteringehalt in den einzelnen Organen des Auges nicht mit Cholesterin gefütterter Kaninchen (Kontrolltiere) fand sich: Cornea im

Durchschnitt 63 mg% ($\pm$ 14 mg%), Sklera 79 mg% ($\pm$ 29 mg%), Uvea 252 mg% ($\pm$ 90 mg%) und Linse 121 mg% ($\pm$ 50 mg%).

Bei mit Cholesterin gefütterten Tieren nahm der Gehalt an Cholesterin in der Linse nicht, in den übrigen untersuchten Organen dagegen um ein Vielfaches zu.

In der Cornea und Sklera stieg er um das etwa 3-4fache, in der Uvea sogar um das etwa 6-fache an, wobei sich allerdings beträchtliche individuelle Unterschiede fanden; die Werte schwankten auch innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen von Tier zu Tier oft erheblich.

Sowohl bei zusätzlich mit Heparin als auch bei mit Essentiale "Nattermann" (essentielle Fettsäuren) behandelten cholesteringefütterten Kaninchen konnte daher wegen der grossen Streuung der Einzelwerte ein Effekt dieser Substanz auf den Umfang der Cholesterinanreicherung in den untersuchten Organen statistisch nicht gesichert werden. Die Einheitlichkeit der Untersuchungsergebnisse (für alle Organe unter Heparineinfluss deutlich, unter Essentialeinfluss mässig niedrigere Durchschnittswerte als bei ausschliesslicher Cholesterinfütterung) lässt aber trotzdem wohl den Schluss zu, dass Heparin und vielleicht auch Essentiale in gewissem Umfang einer Cholesterinablagung in einzelnen Organen des Auges entgegenwirken.

Weiterhin konnte festgestellt werden, dass bezüglich der Höhe des Serumcholesterins und des Gehaltes dieser Substanz in einzelnen Organen des Auges meist Übereinstimmung bestand.

LITERATURVERZEICHNIS.

1. Bierwirth, U.: Dissertation München 1958
2. Bürger, M. u.
 Schlomka G.: Cholesteringehalt von Rinderlinsen in Abhängig-
 keit vom Alter.
 Z. f. exper. Med. 58, 710 (1928)
3. Bürger, M. u.
 Schlomka G.: Cholesteringehalt von Rindercornea in Abhängig-
 keit vom Alter.
 Z. f. exper. Med. 61, 465 (1928)
4. Burge, E.: Der Cholesteringehalt normaler und getrüübter
 menschlicher Linsen.
 Graefes Arch. 139, 50-61 (1938)
5. Cahane, M.: Cholesterin in normalen Linsen vom Rind sowie
 in normalen und kataraktösen Linsen vom
 Menschen in Abhängigkeit vom Lebensalter.
 C.R. Soc. Biol. 108, 992 (1931)
6. Cahn, A.: Zur physiologischen und pathologischen Chemie
 des Auges.
 Z. f. phys. Chem. 5, 212-232 (1881)
7. D'Asaro, B.S. u.
 Young, R.G., u.
 Williams, H.H.: Lipids of the Lens, Cornea, Iris, Ciliar Body
 and Retina.
 A. M. A. Arch. of Ophthalm. 51, 596-598 (1954)
8. Görtz: Biochem. Z. 289, 313 (1937)
9. Goldschmitt, M.: Lipoide in Linsen vom Menschen in Abhängig-
 keit vom Lebensalter.
 Bioch. Z. 127, 210 (1922)
10. Jess, A.: Der Cholesteringehalt des Glaskörpers. Graefes
 Arch. Ophthalm. 112, 80-88 (1923)
11. Krause, A.C.: The Lipids of the Lens.
 Arch. of Ophthalm. 13, 187 (1935)
12. Krause, A.C.: The Lipids of the Sclera, Cornea, Chorioid and
 Iris. Am. J. Phy. 110, 182 (1935)

13. Krause, A.C.: The Lipids of the Retina.
Acta Ophthalm. 12, 372-374 (1934)
14. Lo Cascio, G.: Sulla fine costituzione della retina.
Ricerche chimiche e citologiche.
Ann.di ottal. 51, 653-678 (1923)
Zentralblatt für die gesamte Ophthalmologie 14, 166 (1925)
15. Man, E.B. u. Peters, J.P.: A Method of the Determination of Cholesterol.
J. Biol.Chem. 101, 685 (1933)
16. Purtscher, T.: Cholesteringehalt der Linse bei Caracta coronaria.
Graefes Arch. 144, 447-452 (1942)
17. Salit, P.W.: Lipoidbestimmungen in normalen Tierlinsen, kataraktösen Menschenlinsen und im Blut Starkranker.
Arch.of Ophthalm. 5, 354 (1931)
18. Salit, P.W.: Jahreszeitliche Schwankungen im Lipoidgehalt der Linse.
Arch. of Ophthalm. 18, 403-410 (1937)
19. Salit, P.W. u. O'Brien, C.S.: Cholesterin in normalen und kataraktösen Linsen vom Menschen.
Arch. of Ophthalm. 13, 227 (1935)
20. Salit, P.W.: Total Lipids of Human Cataractous and Scleroed Lenses.
Am.J. Ophthalm. 20, III, 157-165 (1937)
21. Schönheimer, R. u. Sperry, W.M.: A Micromethod for the Determination of Free and Combined Cholesterol.
J.of Biol. Chem. 106, 745-760 (1934)
22. Sperry, W.M. u. Webb, M.: A Revision of the Schoenheimer-Sperry Method for Cholesterol Determination.
J.Biol. Chem. 187, 97-106 (1950)
23. Zeiss, Photometrische Analysen 1958.

LEBENS LAUF

Am 15.12.1931 wurde ich, Bernd Hollenbach, als Sohn des Hauptlehrers Bernhard Hollenbach und seiner Ehefrau Thea, geb. Buschmeier, in Herzebrock/Westfalen geboren.

Nach Übersiedlung meiner Eltern nach Mastholte/Westfalen besuchte ich dort die Volksschule und anschliessend die Ostendorf-Oberschule für Jungen in Lippstadt, wo ich am 5. März 1952 mein Reifezeugnis erhielt.

Im Wintersemester 1952 begann ich mein Medizinstudium in München und legte dort nach dem Wintersemester 1955 meine ärztliche Vorprüfung ab. Anschliessend studierte ich 2 Semester in Münster; die übrigen klinischen Semester war ich an der Universität München immatrikuliert, an der ich am 3. Juni 1958 mein medizinisches Staatsexamen mit Erfolg bestand.



